

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1999 -2775

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **02.02.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **04.02.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/9702218**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.02.2000**
(Věstník č. 2/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/EP98/00644**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/33896**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:
C 12 N 15/00

(71) Přihlašovatel:

SMITHKLINE BEECHAM PLC, Brentford,
GB;
THE GOVERNORS OF THE UNIVERSITY
OF ALBERTA C/O INDUSTRY LIAISON
OFFICE, Alberta, CA;

(72) Původce:

Barton Barry, Worthing, GB;
Griffin John Patrick, Worthing, GB;
Anders Cecilia, Edmonton, CA;
Jensen Susan, Edmonton, CA;
Mosher Roy Henry, Edmonton, CA;
Paradkar Ashish Sudhakar, Edmonton, CA;

(74) Zástupce:

Zelený Pavel JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
120 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Mikroorganismy se zvýšenou produkcí
kyseliny klavulanové**

(57) Anotace:

Nové bakteriální geny, mikroorganismy a způsoby pro zlepšení
výroby 5R klavamů, například kyseliny klavulanové.

CZ 1999 - 2775 A3

25.10.99

PV 0445-99

~~7342~~

Mikroorganismy se zvýšenou produkcí kyseliny klavulanové

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nových bakteriálních genů a způsobů pro zlepšení výroby klavamů, například kyseliny klavulanové. Předkládaný vynález také poskytuje nové organismy, které jsou schopné produkovat zvýšená množství kyseliny klavulanové.

Dosavadní stav techniky

Mikroorganismy, zejména *Streptomyces* sp., produkují mnoho antibiotik včetně kyseliny klavulanové a jiných klavamů, cefalosporinů, polyketidů, cephamycinů, tunikamycinu, holomycinu a penicilinů. Významná je schopnost ovlivňovat absolutní a relativní množství těchto antibiotik produkovaná mikroorganismy a proto existuje mnoho studií zkoumajících metabolické a genetické mechanismy biosyntézy (Domain, A.L. (1990), "Biosynthesis and regulation of beta-lactam antibiotics", v 50 years of Penicillin applications, history and trends). Je známo mnoho enzymů, které provádějí různé kroky v metabolické dráze a genů, které kodují takové enzymy.

Klavamy byly rozděleny do dvou skupin podle stereochemického uspořádání jejich kruhů (5S a 5R klavamy). Biochemické dráhy pro biosyntézu 5R a 5S klavamy nejsou dosud plně známé, ale předpokládá se, že jsou odvozeny od stejných výchozích jednotek (ještě neidentifikované 3 uhlíkové sloučeniny (Townsend, S.. and Ho, M.F. (1985), J. AM. Chem. Soc. 107(4) 1066 - 1068 a Elson, S.W. and Oliver, R.S. (1978), J. Antibiotics XXXI NNo. 6, 568)) a argininu (Valentine, B.P. et al., (1993) J. Am. Chem. Soc. 15:

1210 - 1211) a že mají některé společné meziprodukty (Iwata-Reuyl, D., and C.A. Townsend (1992), J. Am. Chem. Soc. 114: 2762 - 63, a Janc, J.W. et al., (1936); Bioorg. Med. Chem. Lett. 3: 2313 - 16).

Příklady 5S klavamů zahrnují klavam-2-karboxylat (C2C), 2-hydroxymethylklavam (2HMC), 2-(3-alanyl)klavam, valklavam a kyselinu klavaminovou (GB 1585661, Rohl, F. et al., Arch. Microbiol. 147: 315 - 320, US 4202819). Existuje, nicméně, několik příkladů 5R klavamů a nejznámějším je inhibitor beta-laktamasy, kyselina klavulanová, která je produkována fermentací *Streptomyces clavuligerus*. Kyselina klavulanová, ve formě klavulanatu draselného, je kombinována s beta.laktamovým antibiotikem amoxicillinem v antibiotiku AUGMENTIN (obchodní značka SmitKline Beecham). Vzhledem k tomuto komerčnímu významu se výzkum biosyntézy klavamů zaměřil na biosyntézu 5R klavamu, kyseliny klavulanové, *S. clavuligerus*. Bylo identifikováno a publikováno mnoho enzymů a jejich genů spojených s biosyntézou kyseliny klavulanové. Příklady takových publikací jsou Hodgson, J.E. et al., Gene 166: 49 - 55 (1995), Aidoo, K.A: et al., Gene 147: 41 - 46 (1994), Paradkar, A.S. et al., J. Bact. 177(5): 1307 - 14 (1995). Oproti tomu není nic známo o biosyntéze a genetice 5S klavamů jiných než kyselina klavaminová, která je prekursorem kyseliny klavulanové produkovaným působením syntázy kyseliny klavaminové v biochemické dráze kyseliny klavulanové v *S. clavuligerus*.

Genové klonovací pokusy identifikovaly, že *S. clavuligerus* obsahuje dva izoenzymy syntázy kyseliny klavaminové, *cas1* a *cas2* (Marsh, E.N. et al., Biochemistry 31, 12684-657 (1992)), které mohou oba způsobovat produkci kyseliny klavulanové za určitých nutričních podmínek (Paradkar, A.S. et al., J. Bact. 177(5): 1307 - 14 (1995)). Aktivita syntázy kyseliny klavaminové byla také

identifikována v jiných mikroorganismech produkujících kyselinu klavulanovou, t.j. v *S. jumonjinensis* (Vidal, C.M., ES 550549 (1987)) a *S. katsurahamanus* (Kitano, K. et al., JP 53-104796 (1978)), stejně jako v *S. antibioticos*, což je producent 5S klavamu, valklavamu (Baldwin, J.E. et al., Tetrahedron Letts. 35(17): 2783 - 86 (1994)). Poslední uvedená studie také uvádí, že *S. antibioticos* má amidino-hydrolasovou aktivitu pro proklavaminovou kyselinu, t.j. aktivitu dalšího enzymu, který se účastní biosyntézy kyseliny klavulanové. Všechny další geny identifikované v *S. clavuligerus*, která participují na biosyntese klavamů, se účastní biosyntézy kyseliny klavulanové (Hodgson, J.E. et al., Gene 166: 49 - 55 (1995), Aidoo, K.A. et al., Gene 147: 41 - 46 (1994)) a nebyl popsán žádný gen, který je specifický pro biosyntézu 5S klavamů.

Podstata vynálezu

Nyní jsme identifikovali některé geny, které jsou specifické pro biosyntézu 5S klavamů, jako jsou například C2C a 2HMC u *S. clavuligerus*. V souladu s tím poskytuje předkládaný vynález DNA obsahující jeden nebo dva geny, které jsou specifické pro biosyntézu 5S klavamů u *S. clavuligerus* a které nejsou zásadní pro biosyntézu 5R klavamu (například kyseliny klavulanové).

Termín "gen", jak je zde použit, zahrnuje také jakýkoliv regulační region nutný pro funkci a expresi genu. Ve výhodném provedení má DNA sekvenci uvedenou na obr. 1. Výhodně obsahuje DNA sekvence nukleotidů uvedené na obr. 1 a označené jako orfup3, orfup2, orfup1, orfdwn1, orfdwn2 a orfdwn3. Předkládaný vynález také poskytuje proteiny kodované uvedenou DNA. Předkládaný vynález také poskytuje vektory obsahující DNA podle předkládaného vynálezu a hostitele obsahující takové vektory.

Překvapivě jsme zjistili, že pokud je alespoň jeden z genů podle předkládaného vynálezu defektní, tak je množství kyseliny klavulanové produkované organismem zvýšeno. V souladu s tím předkládaný vynález také poskytuje způsoby pro zvýšení množství kyseliny klavulanové produkovaného vhodným mikroorganismem. V jednom aspektu vynálezu mohou být identifikované geny upraveny tak, že vznikne organismus, který je schopen produkce zvýšeného množství klavamu, výhodně kyseliny klavulanové. Tyto objevy také zlepšují způsoby pro identifikaci organismů s vyšší produkcí kyseliny klavulanové, včetně předběžného vyhledávání organismů s nízkou nebo žádnou produkcí 5S klavamu (například hplc a/nebo klavamový biotest, jak je popsán dále v příkladech).

Vhodné geny pro 5S klavamy podle předkládaného vynálezu mohou být získány běžnými technikami klonování (jako je PCR) na základě sekvencí, které jsou zde uvedené. Funkce genu může být změněna nebo eliminována/deletována genetickými technikami jako je narušení genu (Aidoo, K.A: et al., Gene 147: 41 - 46 (1994)), náhodná mutagenese, místně cílená mutagenese a protismyslná DNA.

V dalším aspektu vynález poskytuje plasmidy obsahující jeden nebo více defektních genů, výhodně plasmidy pCEC060, pCEC061, pDES3, pCEC056 a pCEC057, jak jsou popsány dále. Geny mohou být učiněny defektními různými způsoby. Například inserce fragmentu DNA kodujícího gen resistance na antibiotika může zcela zrušit aktivitu tohoto genu. Alternativně mohou být použity jiné strategie pro výrobu defektních genů, včetně inserce DNA nekodujícího gen resistance na antibiotika, delece části genu, delece celého genu nebo alterace nukleotidové sekvence genu adicí a/nebo substitucí jednoho nebo více nukleotidů. Defektní geny podle předkládaného vynálezu mohou být defektní v různém rozsahu. Mohou být defektní tak, že jejich aktivita je zcela zrušena, nebo může být část původní aktivity zachována.

Výhodně jsou plasmidy podle předkládaného vynálezu použity pro transformaci organismů jako je *S. clavuligerus*, například kmen ATCC 27064 (což odpovídá *S. clavuligerus* NRRL 3585). Vhodné techniky pro transformaci mohou být vyhledány v literatuře, například v Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory manual*, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; Hopwood, D.A: et al., (1985), *Genetic manipulation of Streptomyces. A Cloning Manual*, a Paradkar, A.S. et al., *J. Bact.* 177(5): 1307 - 14 (1995).

Kmeny druhu *S. clavuligerus* jsou průmyslově využívány pro výrobu kyseliny klavulanové. V Britském a Americkém Lékopise pro draselnou sůl kyseliny klavulanové (British Pharmacopoeia 1993, Addendum 1994, str. 1362-3 a U.S. Pharmacopoeia Official Monographs 1995, USP 23 NF18 str. 384-5) je konkrétně kontrolováno množství toxického 5S klavamu, klavam-2-karboxylatu.

Proto v dalším aspektu vynález poskytuje organismus, který je schopný produkovat velká množství kyseliny klavulanové, ale který není schopen produkovat C2C nebo který je schopen produkovat velká množství kyseliny klavulanové, ale produkuje pouze malé množství C2C. Výhodně obsahuje organismus produkující kyselinu klavulanovou jeden nebo více defektních klavamových genů, a výhodně jím je *S. clavuligerus* kmene 56-1A, 56-3A, 57-2B, 57-1C, 60-1A, 60-2A, 60-3A, 61-1A, 61-2A, 61-3A a 61-4A, které jsou popsány dále. Takové organismy jsou vhodné pro produkci kyseliny klavulanové bez produkce 5S klavamu, klavam-2-karboxylatu nebo s významně sníženou produkcí klavam-2-karboxylatu.

Příklady provedení vynálezu

V příkladech jsou všechny metody provedené způsobem podle

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory manual, 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; Hopwood, D.A: et al., (1985), Genetic manipulation of Streptomyces. A Cloning Manual, a Paradkar, A.S. and Jensen, S.E., J. Bacteriol. 177(5): 1307 - 1314 (1995), pokud není uvedeno jinak.

Příklad 1: DNA sekvencování chromosomu *S. clavuligerus* ve smyslu sekvence a proti smyslu sekvence genu *cas1* klavaminat syntasy

A. Izolace *cas1*

Pro izolaci fragmentů chromosomální DNA *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585 kodujících gen pro klavaminat syntasu - izoenzym 1 (*cas1*) byla syntetizována oligonukleotidová sonda RMO1 na základě nukleotidů 9-44 známé sekvence *cas1* genu (Marsh, E.N., Chang, M.D.T. and Townsend, C.A. (1992), Biochemistry 31: 12648 - 12657). Oligonukleotidy byly vyrobeny za použití běžných technik na Applied Biosystems 391 DNA Synthetiser. Sekvence RMO1, 36-meru, byla syntetizována v opačném směru, než publikoval Marsh et al., (1992). RMO1 byl radioaktivně značen ^{32}P za použití standardních technik pro koncové značení DNA oligonukleotidů (Sambrook et al., 1989) a byl použit pro vyšetřování kosmidové banky genomové DNA *Streptomyces clavuligerus* Southern hybridizací, jak jí popisuje Stahl and Amann ("Nucleic acid techniques in bacterial systematics", E. Stackebrandt and M. Goodfellow, Toronto: John Wiley and Sons, str. 205 - 248, 1991). Genomová banka DNA *S. clavuligerus*, připravená v kosmidu pLAFR3, byla stejná, jak jí popisuje Doran, J.L. et al., (1990), J. Bacteriol. 172(9): 4909 - 4918.

Skvrny kolonií kosmidové banky *S. clavuligerus* byly inkubovány přes noc s radioaktivně značeným RMO1 při 60 °C v roztoku

skládajícím se z 5 x SSC, 5 x Denhartův roztok a 0,5% SDS (1 x SDS: 0,15 M NaCl + 0,015 M Na₃citrat; 1 x Denhartův roztok: 0,02% BSA, 0,02% Ficoll a 0,02% PVP). Skvrny byly potom promyty při 68 °C po dobu 30 minut v roztoku 0,5 x SSC + 0,1% SDS. Byl izolován jeden kosmidový klon, 10D7, který silně hybridizoval s RMO1 a dával hybridizační signály po trávení restrikcčními endonukleasami SacI a EcoRI, které odpovídaly hybridizačním signálům detekovaným v podobných pokusech s trávením genomové DNA *S. clavuligerus*.

B. DNA sekvencování regionů chromosomu *S. clavuligerus* sousedících s *cas1*

Částečná restrikcční mapa kosmidu 10D7 byla vyrobena za použití restrikcčních endonukleas SacI, NcoI a KpnI. Southern hybridizace mezi RMO1 a různými produkty trávení 10D7 DNA ukázala, že *cas1* je s největší pravděpodobností umístěn na jednom konci 7-kb SacI-SacI DNA subfragmentu. Tento fragment se skládá z *cas1* otevřeného čtecího rámce a přibližně 6 kb DNA ve směru kodujícího řetězce. 7-kb fragment byl potom subklonován z produktu trávení 10D7 SacI ve fagenidovém vektoru pBluescriptII SK+ (2,96 kb; Stratagene), za vzniku rekombinantního plasmidu pCEC007.

Pro usnadnění sekvencování chromosomu proti směru kodujícího řetězce od *cas1* byl 3-kb NcoI-NcoI subfragment 7-kb SacI-SacI fragmentu subklonován v pUC120 (3,2 kb; Vieira and Messing, Methods Enzymol. 153: 3 - 11, 1987) v obou orientacích, za vzniku rekombinantních plasmidů pCEC026 a pCEC027. 3-kb subfragment se skládal z amino-koncové kodující části *cas1* a přibližně 2,6 kb DNA proti směru kodujícího řetězce.

Komplementární, přesahující delece byly vytvořeny jak v pCEC026, tak v pCEC027, za použití trávení exonukleasou III a S1 nukleasou (Sambrook et al., 1989) a DNA sekvence 3-kb NcoI-NcoI

fragmentu byla určena v obou řetězcích Sangerovým sekvencováním (Sanger, F., Nicklen, S. a Coulson, A.R. (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5493 - 5467) za použití Taq dye-deoxy^a terminator kitu a Applied Biosystems 373A Sequencer.

Pro určení DNA sekvence chromosomu bezprostředně po směru kodující sekvence od cas1 byl 4,3 kb KpnI-EcoRI DNA fragment subklonován z kosmidového klonu 10D7 v pBluescript SK+, za vzniku pCEC018. Z pCEC018 byl 3,7 kb SacI-SacI subfragment klonován v pSL1180 (3,422 kb, Pharmacia); jeden SacI konec tohoto fragmentu částečně přesahoval TGA stop kodon cas1, druhý byl kodován vektorem. Během subklonování byly získány obě orientace a vzniklé rekombinantní plasmidy byly označeny pCEC023 a pCEC024. Komplementární, přesahující delece byly vytvořeny v obou plasmidech a DNA sekvence 3,7-kb fragmentu byla určena pro oba řetězce. Sekvence nukleotidů chromosomu *S. clavuligerus* získaná v tomto pokusu, včetně sekvence sousedící s cas1, je uvedena na obr. 1.

Příklad 2: Funkční analýza otevřených čtecích rámců obklopujících cas1

Počítačová analýza DNA sekvence ve směru kodující sekvence od cas1 předpověděla přítomnost dvou kompletních orf a jednoho nekompletního orf. Všechny tři orf byly umístěny na opačném DNA řetězci než cas1 a byly proto opačně orientované. První otevřený čtecí rámec, orfup1, byl umístěn 579 bp ve směru kodující sekvence od cas1 a kodoval polypeptid o 344 aminokyselinách (aa). Druhý otevřený čtecí rámec, orfup2, byl umístěn 437 bp za 3' koncem orfup1 a kodoval polypeptid o 151 aminokyselinách (aa). Za orfup2 byl orfup3. Start kodon orfup3 přesahuje translační stop kodon orfup2, což naznačuje, že tyto dva orf jsou translačně spřaženy. Žádný translační stop kodon pro orfup3 nebyl umístěn na

3-kb NcoI-NcoI fragmentu.

Podobná analýzy DNA sekvence proti směru kodující sekvence od *cas1* předpověděla přítomnost dvou kompletních orf a jednoho nekompletního orf. Dva orf byly umístěny na opačném DNA řetězci než *cas1* a byly proto tak orientovány k *cas1*. Třetí orf byl umístěn na stejném DNA řetězci jako *cas1* a byl tak orientován od *cas1*. První otevřený čtecí rámec ve směru po kodujícím řetězci, *orfdwn1*, byl umístěn 373 bp po směru kodujícího řetězce od *cas1* a kodoval polypeptid o 328 aa. Druhý otevřený čtecí rámec, *orfdwn2*, byl umístěn 55 bp proti směru kodujícího řetězce od *cas1* a kodoval polypeptid o 394 aa. 315 bp ve směru kodujícího řetězce od *orfdwn2* a na opačném řetězci byl *orfdwn3*. Jelikož pro *orfdwn3* nebyl na 3,7 kb fragmentu zjištěn žádný stop kodon, je jasné, že koduje nekompletní polypeptid o 219 aa.

Genové narušení *orfup* a *orfdwn* otevřených čtecích rámců

Pro hodnocení možného významu otevřených čtecích rámců obklopujících *cas1* v biosyntéze kyseliny klavulanové a jiných klavamů produkovaných *S. clavuligerus* byly technikou genových náhrad vytvořeny inserční inaktivační nebo deleční mutanty. Technika pro narušení genů a náhradu genů byla stejná, jak jí popisuje Paradkar a Jensen (1995).

A. *orfup1*

1,5 kb NcoI-NcoI fragment nesoucí gen resistance na apramycin (*apr^r*) vyrobený způsobem, který popsali Paradkar a Jensen (1995), reagoval s Klenow fragmentem pro vyrojení lepivých konců (Sambrook et al., 1989) a byl ligován do pCEC026, který byl tráven BsaBI a také Klenow fragmentem. pCEC026 má BsaBI místo umístěné v *orfup1* 636 bp od translačního start kodonu. Ligační

směs byla použita pro transformaci kompetentních buněk *E. coli* GM 2163 (dostupných od New England Biolabs, USA, Marinus, M.G. et al., M G G (1983), svazek 122, str. 288 - 9) pro získání resistance na apramycin. Z výsledných transformantů byly izolovány dva klony obsahující plasmidy pCEC054 a pCEC055; při restriční analýze pCEC054 bylo zjištěno, že obsahuje apr^r -fragment insertovaný ve stejné orientaci jako orfup1, zatímco pCEC055 jej obsahuje v opačné orientaci.

Pro vložení pCEC054 do *S. clavuligerus* byla plasmidová DNA trávena BamHI a HindIII a byla ligována do *Streptomyces* vektoru pIJ486 s vysokým počtem kopií (6,2 kb; Ward et al., (1986), Mol. Gen. Genet. 203: 468 - 478). Ligační směs byla použita pro transformaci kompetentních buněk *E. coli* GM 2163 pro získání resistance na apramycin. Z výsledných transformantů byl izolován jeden klon obsahující kyvadlový plasmid pCEC061. Tento plasmid byl potom použit pro transformaci *S. clavuligerus* NRRL 3585. Výsledné transformanty se nechaly dvakrát sporulovat na neselektivním mediu a potom byly duplicitně umístěny na mediu obsahujícím antibiotikum pro identifikaci resistance na apramycin a pro identifikaci transformantů sensitivních na thiostrepton. Pro další analýzu byly vybrány čtyři domnělé mutanty (61-1A, -2A, 3A a -4A).

Pro potvrzení toho, že tyto domnělé mutanty obsahují narušení orfup1, byla připravena genomová DNA z izolátů 61-1A a 61-2A, byla trávena SacI a byla podrobena Southern blot analýze. Výsledky Southern blot analýzy byly v souladu s dvojnásobným crossing-overem a potvrdily, že tyto mutanty skutečně obsahují narušení orfup1.

Mutanty 61-1A, -2A, -3A a -4A byly kultivovány v mediu ze sojové moučky a supernatanty kultur byly testovány HPLC na

produkci kyseliny klavulanové a jiných klavamů. Složení media ze sojové moučky a postupu pro testování na přítomnost klavamů pomocí HPLC byly stejné, jak byly popsány dříve (Paradkar a Jensen, 1995) s tou výjimkou, že pracovní pufr pro HPLC se skládal z 0,1 M NaH_2PO_4 + 6% methanol, pH 3,68 (upraveno ledovou kyselinou octovou). HPLC analýza ukázala, že žádný z mutantů neprodukoval detekovatelné koncentrace klavam-2-karboxylátu nebo 2-hydroxymethylklavamu. Dále, když byly supernatanty kultur biologicky testovány proti *Bacillus* sp. ATCC 27860, za použití techniky, kterou popsali Pruess a Kellett (1983, J. Antibiot. 36: 208 - 212), neprodukoval žádný z těchto mutantů detekovatelné hladiny alanylklavamu. Naopak, HPLC testy supernatantů kultur ukázaly, že mutanty produkují vyšší koncentrace kyseliny klavulanové než přirozené organismy (tabulka 1).

Tabulka 1: Titr klavulanové kyseliny (CA) pro orfup1 mutanty v kulturách

Kmen	70 hodin CA $\mu\text{g/ml}$	70 hodin CA $\mu\text{g/mg}$ DNA	93 hodin CA $\mu\text{g/ml}$	93 hodin CA $\mu\text{g/mg}$ DNA
NRRL 3585#1	87	915	166	1963
NRRL 3585#2	66	790	159	1842
61-1A	272	2894	439	6113
61-2A	199	2148	225	2928
61-3A	54	692	221	2585
61-4A	0	0	226	2422

orfup1 delece

Byly provedeny klonovací pokusy pro vytvoření genové delece 654 nukleotidů mezi AAtII místy orfup1. PCR produkty byly

vyrobeny za použití oligonukleotidových primerů uvedených dále a výše uvedeného pCEC061 jako templátu. Původní nukleotidová sekvence byla pozměněna tak, aby obsahovala PstI v oligo 11 a SphI místo v oligo14.

Pár 1 oligonukleotidů použitý k výrobě PCR produktu 1

Primer 11: 5'- dCTGACGCTGCAGGAGGAAGTCCCGC - 3'

Primer 12: 5'- dCGGGGCGAGGACGTCGTCCCGATCC - 3'

Pár 2 oligonukleotidů použitý k výrobě PCR produktu 2

Primer 13: 5'- dGAGCCCCTGGACGTCGGCGGTGTCC - 3'

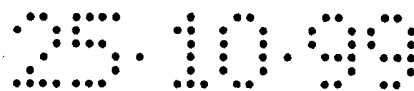
Primer 14: 5'- dGACGGTGCATGCTCAGCAGGGAGCG - 3'

Standardní PCR reakce byly provedeny za použití PTC-200 Peltier termálního cyklovače od GRI (Felsted, Dunmow, Essex, CM6 3LD).

PCR produkt 1 byl vyroben za použití primerů 11 a 12. Tento produkt má délku přibližně 1 kb a obsahuje karboxy-konec orfup1 od druhého AatII místa a regiony po směru kodující sekvence.

PCR produkt 2 byl vyroben za použití primerů 13 a 14. Tento produkt má délku přibližně 1,1 kb a obsahuje amino-konec orfup1 od druhého AatII místa a regiony proti směru kodující sekvence.

PCR produkt 2 byl ligován do pCR-Script Amp SK(+) tráveného SrfI podle návodu výrobce (Stratagene Ltd., Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 4GF). Ligační směs byla použita pro transformaci Epicurian E. coli XL1-Blue MRF' Kan superkompetentních buněk (dostupných od Stratagene) pro vyvolání resistance na ampicilin (podle návodu výrobce). Plasmidová DNA



byla izolována z výsledných transformantů a restriční analýza DNA ukázala, že 7 klonů obsahuje plasmid, do kterého byl ligován PCR produkt 2. Jeden z těchto plasmidů byl označen pDES1.

PCR produkt 1 byl tráven PstI a AatII a vzniklá DNA byla frakcionována agarosovou gelovou elektroforesou. 1 kb fragment byl excidován a eluován z gelu pomocí Sephaglass band prep kitu (Pharmacia, St. Albans, Herts, ALI3AW). Izolovaný fragment byl potom ligován do AatII a PstI tráveného pDES1. Ligační směs byla použita pro transformaci *E. coli* XL1-Blue kompetentních buněk (dostupných od Stratagene) pro vyvolání resistance na ampicilin (podle návodu výrobce). Plasmidová DNA byla izolována z výsledných transformantů a restriční analýza DNA ukázala, že 1 klon obsahuje plasmid, do kterého byl ligován PCR produkt 1. Tento plasmid byl označen pDES2.

Pro vložení pDES2 do *S. clavuligerus* byl plasmid dále upraven tak, aby obsahoval element rozpoznávající počátek replikace, který účinkuje v *Streptomyces*. Za tímto účelem byla plasmidová DNA pDES2 trávena EcoRI a HindIII a potom byla ligována do *Streptomyces* vektoru pIJ486 s vysokým počtem kopií (6,2 kb; Ward et al., (1986), Mol. Gen. Genet. 203: 468 - 478), který byl také tráven EcoRI a HindIII. Ligační směs byla použita pro transformaci *E. coli* (JM-109) kompetentních buněk (Stratagene) pro vyvolání resistance na ampicilin. Plasmidová DNA byla izolována z výsledných transformantů a restriční analýza DNA ukázala, že 6 klonů obsahuje pDES2 obsahující pIJ486. Jeden z těchto plasmidů byl označen pDES3. Plasmid pDES3 byl použit pro transformaci *S. clavuligerus*, ve kterém byl gen pro orfup1 již dříve narušen insercí genu pro resistenci na apramycin (jak je uvedeno výše). Byly selektovány transformanty resistantní na thiostrepton a tyto transformanty se nechaly 3-krát sporulovat na neselektivním mediu a vyšetřovaly se na ztrátu resistance na

apramycin. Při tomto postupu bylo identifikováno 45 mutantů, které ztratily resistenci na apramycin. Tyto mutanty byly potom analyzovány HPLC, která potvrdila, že tyto kmeny, podobně jako kmeny 61-1A, 61-2A, 61-3A a 61-4A s narušeným orfup1, nebyly schopné produkovat klavam-2-karboxylat a 2-hydroxymethylklavam při kultivaci za takových podmínek, při kterých jsou tyto klavamy normálně produkovány.

B. orfdwn1 a orfdwn2

Deleční/substituční mutanty orfdwn1 a orfdwn2 byly vytvořeny nejprve trávením pCEC018 (7,3 kb) NcoI a uvolněním 1-kb fragmentu obsahujícího většinu orfdwn1 a část orfdwn2. Fragment byl frakcionován agarosovou gelovou elektroforesou a 6,3-kb fragment byl excidován a eluován z tohoto gelu. Tento fragment byl ligován do NcoI-NcoI DNA fragmentu nesoucího apr^r a byl použit pro transformaci E.coli XL1-Blue pro získání resistance na apramycin. V tomto pokusu byl získán jeden klon, ale restriční analýza výsledného rekombinantního plasmidu ukázala, že dvě kopie fragmentu resistance na apramycin byly ligovány do delece plasmidu. Pro eliminaci extrakopie apr^r-fragmentu byl plasmid tráven NcoI a samoligován. Ligační směs byla použita pro transformaci E. coli GM2163 pro získání resistance na apramycin. Z těchto transformantů byly izolovány dva klony, které obsahovaly plasmidy pCEC052 a pCEC053, které měly oba pouze jednu kopii apr^r-fragmentu; pCEC052 obsahoval apr^r-fragment v opačné orientaci vzhledem k orfdwn1 a 2, zatímco pCEC053 obsahoval apr^r-fragment ve stejné orientaci vzhledem k orfdwn1 a 2.

Kyvadlový plasmid pCEC052 byl vyroben ligací BamHI-tráveného pCEC052 se stejně tráveným pIJ486 a transformací E. coli GM2163 pro vyvolání resistance na apramycin. Z tohoto pokusu byl izolován jeden klon, který obsahoval kyvadlový plasmid pCEC060.

Tento plasmid byl použit pro transformaci přirozeného *S. clavuligerus* 3585 pro vyvolání resistance na apramycin a thiostrepton. Výsledné transformanty se nechaly dvakrát sporulovat na neselektivním mediu a potom byly duplicitně umístěny na mediu obsahujícím antibiotikum pro identifikaci resistance na apramycin a pro identifikaci transformantů sensitivních na thiostrepton. Pro další analýzu byly vybrány tři domnělé mutanty (60-1A, -2A a 3A).

Pro určení identity těchto domnělých mutantů byla připravena genomová DNA z izolátů 60-1A a 60-2A a byla trávena *SacI* nebo *BstEII* a byla podrobena Southern blot analýze. Hybridizační proužky v tomto pokusu odpovídaly tomu, že u obou kmenů proběhl dvojnásobný crossing-over a potvrdily, že tyto mutanty skutečně obsahují narušení *orfDwn1/2*.

Při kultivaci těchto mutantů na mediu ze sojové moučky a testování supernatantů kultur HPLC neprodukoval žádný z mutantů detekovatelné koncentrace klavam-2-karboxylatu nebo 2-hydroxymethylklavamu. Biologický test supernatantů kultur také neukázal žádnou produkci detekovatelných hladin alanylklavamu. Stejně jako *orfUp1* mutanty jsou *orfDwn1/2* mutanty schopné produkce vyšších koncentrací kyseliny klavulanové než přirozené organismy (tabulka 2).

Tabulka 2: Titr klavulanové kyseliny (CA) pro orfdwn1/2 mutanty v kulturách

Kmen	70 hodin	70 hodin	93 hodin	93 hodin
	CA $\mu\text{g/ml}$	CA $\mu\text{g/mg DNA}$	CA $\mu\text{g/ml}$	CA $\mu\text{g/mg DNA}$
NRRL 3585#1	87	915	166	1963
NRRL 3585#2	66	790	159	1842
60-1A	164	1872	260	2911
60-2A	187	2013	108	1320
60-3A	79	994	214	2161

orfdwn3

Pro narušení orfdwn3 byl pCEC023 (skládající se z 3,7 kb fragmentu DNA ve směru řetězce od cas1 subklonovaného do pSL1180) tráven NcoI a potom samo-ligován. Po transformaci E. coli ligační směsí byl izolován klon, který obsahoval plasmid pCEC031. Tento plasmid si zachoval pouze 1,9 kb NcoI-EcoRI fragmentu kodujícího část orfdwn2 a nekompletní orfdwn3. Analýza DNA sekvence ukázala, že pCEC031 obsahuje jedinečné BstEII místo v 158 bp od translačního start místa pro orfdwn3. Proto byl pCEC031 tráven BstII, zpracován Klenow fragmentem pro vytvoření lepivých konců a potom byl ligován do kazety apramycinové resistance opatřené lepivými konci. Ligační směs byla použita pro transformaci E. coli GM2163 pro získání resistance na apramycin a ampicilin. Byly vybrány dva transformanty, které obsahovaly pCEC050 a pCEC051, v příslušném pořadí. Restrikční analýza ukázala, že kazeta apramycinové resistance je orientována stejně jako orfdwn3 v pCEC050 a opačně v pCEC051. Oba tyto plasmidy byly potom tráveny HindIII a ligovány do stejně tráveného pIJ486. Ligační směsi byly potom použity pro transformaci E. coli GM2163

pro získání resistance na apramycin a ampicilin. Z výsledných transformantů byly izolovány kyvadlové plasmidy pCEC056 (pCEC050 + pIJ486) a pCEC057 (pCEC051 + pIJ486). Oba plasmidy byly potom použity pro transformaci *S. clavuligerus* NRRL 3585.

Z každého pokusu byl vybrán jeden transformant nechal se dvakrát sporulovat na neselektivním mediu a potom byl duplicitně umístěn na mediu obsahujícím antibiotikum pro identifikaci resistance na apramycin a pro identifikaci transformantů sensitivních na thiostrepton. Z tohoto pokusu byly vybrány dva domnělé mutanty z potomstva každého primárního transformantu (56-1A a 56-3A pro pCEC056 a 57-1C a 57-2B pro pCEC057).

Pro určení identity těchto domnělých mutantů byla připravena genomová DNA z těchto kmenů a byla trávena *SacI* nebo *Acc65I* a byla podrobena Southern blot analýze. Hybridizační proužky v tomto pokusu odpovídaly tomu, že u obou kmenů proběhl dvojnásobný crossing-over a potvrdily, že tyto mutanty skutečně obsahují narušení *orfdown3*.

Při kultivaci těchto mutantů na mediu ze sojové moučky a testování supernatantů kultur HPLC produkovaly mutanty významně redukované koncentrace klavam-2-karboxylatu nebo 2-hydroxymethylklavamu. Biologický test supernatantů kultur také neukázal žádnou produkci detekovatelných hladin alanylklavamu. Stejně jako *orfup1* a *orfdown1/2* mutanty jsou *orfdown3* mutanty schopné produkce vyšších koncentrací kyseliny klavulanové než přirozené organismy (tabulka 3).

Tabulka 3: Titr klavulanové kyseliny (CA) pro orfdwn3 mutanty v kulturách

Kmen	70 hodin CA $\mu\text{g/ml}$	70 hodin CA $\mu\text{g/mg DNA}$	93 hodin CA $\mu\text{g/ml}$	93 hodin CA $\mu\text{g/mg DNA}$
NRRL 3585#1A	180	1580	193	1790
NRRL 3585#1B	179	1640	266	2310
56-1A	34	110	235	2160
56-3A	225	2140	274	2740
57-1C	253	2910	277	2920
57-2B	242	2240	193	1860

Vynález obsahuje následující sekvence nukleotidů:

- SEQ ID No. 1: DNA sekvence obr. 1
- SEQ ID No. 2: sekvence orfup3
- SEQ ID No. 3: sekvence orfup2
- SEQ ID No. 4: sekvence orfup1
- SEQ ID No. 5: sekvence orfdwn1
- SEQ ID No. 6: sekvence orfdwn2
- SEQ ID No. 7: sekvence orfdwn3
- SEQ ID No. 8: sekvence oligonukleotidového primeru 11
- SEQ ID No. 9: sekvence oligonukleotidového primeru 12
- SEQ ID No. 10: sekvence oligonukleotidového primeru 13
- SEQ ID No. 11: sekvence oligonukleotidového primeru 14

Obr. 1: Nukleotidová sekvence cas1 *S. clavuligerus* včetně sousedních regionů

NcoI

1 GGTACCGCCCGCCGCGGACGGGGCCCTCGGAGCCGGCCTGGCCACTGGTCCTGGTGGGGCC 60
M A P P P Q G P A E A P G T V L V V G

61 ACCCTATCACCGGGCGGTGGGCGCGCTCGTCTGAGGGCCCTGTGCCTGGGCACCCACACGC 120
T P Y H G A V R R L L S G S V S G H T H

. <orfup3

121 GCCTTTCCGGGCGCTCCGGCCCCAGTGTGCGGTGCCCCATTGCGGCCACAGGAACGGGGCGCAT 180
* L W P Y R A T D K G A Y
A S L G P P R T M

.

181 TAGCCCCAGGTCTATCTGCTTCCGGGCCACCTGCTCCTTCAGGGCGTGGAGCATCTGGCA 240
D P D L Y V F A R H V L F D R V E Y V T

.

241 CGTGGTTCGCGGGCCCGGGGTGAGCCCCAGTGGGCGGGCGGTGCCGGGCAGGGCCACGAG 300
C W R G A A W E P D G A R W P G D R H E

.

301 TGGCACCCACCACGGGAGGCGCCGCTCCTCAAGCCAGGGCCAGTCTTAGGTCAACTGCCT 360
G H T T G E A A L L E T G T L I W N V S

.

361 GGTGTCTACCACCCACTAGCTCGCCTACCACGGGGGCTCCAGCAGCTTCTCGGCCCGCTA 420
W L H H T I S R I T G G L D D F L R A I

.

421 GAGCCTGAACGGGGCCCGGTCTGGGGTGAACCCCTTCTTCTTCTGGCGCAGGAGCCGCTT 480
E S K G R A L G W K P F F F V A D E A F

.

481 CATCAGCTAGCGCCCCACGGCAGCGACGGCTGCGGGCGGCAACAGCTTGCGGAACTTCAT 540
Y D I A P T G D S G V G G N D F A K F Y

. <orfup2

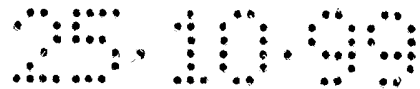
541 GCGCCACTACTGGCGGAACGCGACGAGCAGGCAGTATGGCCGGCTACGGTGCCTGTACTT 600
A T I V A K R Q E D T M G A S A V S M

.

601 TGCTGGAGGTCTCTAAGGCCCCACCGACACGACCCCGACGCGCTTCCCCACAGGGGGCGCTT 660



661 CCTGCCGCTGCGGGCGCTGCGGGCGCCGGCAGAGGGGGCCGCTGCCAGGGTCCGAGGAC 720
 721 CTCTCCCGAACC GCCCGCCGAACTGCGGCACGACAGGGCGCCGAACGCCTTGCGCTTCATG 780
 781 GCGGGTCCGATGCCCCCAACGTGGCCTGCACATGCGGGCCAGCCCTGGGGAGCATGGGGGC 840
 841 CTCGGCCGGCTGGGGCCGCGGAGGCCCCCATGCCTGCGGGCCTGGCCGGGCTCGCTCGG 900
 901 CCTGCCAGCCTGCCACGCGCACCAAGGCCACACAGCCTGTGAGCCTGCCTGGCCTGCC 960
 961 ACGCGCACCAAGGCCACACAGCCTGTGAGCCTGCCAGCCTGCCACGCGCACCAAGGCC 1020
 1021 GTGCGGCCTGCCAGTCAACGGCTAGTACCGCTCGTTACGGCCCCACATGGCGAGGGGCC 1080.
 * N G I M A L L A P T Y R E G
 1081 TGTGGCCCACCTCTAGCGCCGGCAGTGGAGGCGCTCCCTGGCCAGCAGGTCCGCCTAGC 1140
 S V P H S I A A T V E A L S R D D L R I
 1141 TCCGCGCCGCTCTAACAGGCGCTCTACCCGGCCCCAAGCGCCACGGGCCCTAGCCCTGCT 1200
 S A A A L N D A L H A P N A T G P I P V
 1201 GCAGGAGCGGGGCCACCACGTCCGTCCGCTCGCGCTCGACACGGTCCCAGTCCGGGGTCTG 1260
 V D E G R H H L W A L A L Q A L T L G L
 1261 GCAGGCGCTGGCCCGCTCGGCCACGTCCGTTGCTCGCCAACGCGCGCTCCCGGCCCTCGCG 1320
 G D A V P R L R H L L S R N R A L A P A
 1321 ACTTGGCCCCGACCGGGGCCGCTTCAGGAGCAGGGGGTCTAGCAGCCACCACGCCTACC 1380
 S F R P Q G R R F D E D G L D D T T R I
 1381 ACGGCCACTCTTTGGGGCAGGGTCTCCCCGCATTGCTGCTAGGGCTAGGGGTGAGGG 1440
 T G T L F G R G L P A Y A V I G I G L E
 1441 CCGTCTGCCCGTGGTGGAGCAGGAGCTAGGGCCGCGTGGTGTCCGAGGTGAGCGAGACGT 1500
 R C V P V V E D E I G R S W L S W E S Q
 1501 GCGGGCAGTGGCCCCAGTGGCGCAGGCGGGCCGCGTCCGACCGGGCCCTCCCGAGCCTCT 1560
 V A T V P H V A D A R R L T A A S P E S



1561 CTGGCTCGGACGCCTGGAAACGGGAGCGCGTGGTTCGAGCCGGTGGCGTGGGTGCCAGAGGA 1620
 L G L R R V K G E R V L E A V A G V T E

1621 GCTAGCCCGTGGCGGGCCAGGCAGGTCACGACCATCATGTCCAGCTACGCCAGCCACGGCT 1680
 E I P V A P D T W H Q Y Y L D I R D T G

1681 CTGCTGCGTCCCTGGCAAGCGTCCGGCGCGCCTGCATCCTGCCGAGCGGGCGTGTTCGGGA 1740
 L R R L S R E C A A R V Y S P E G C L G

1741 CCGTCCGCGGCAGCCTGCTCGCGTGGTACGGCTTGAACCCAGCTAGTCCGTGGAGCAGGG 1800
 Q S A G D S S R V M G F K T A I L V E D

1801 CCGCCGGGCGCTGGCGGGCAGGCTCGTCCAGGAGTGGCCGGCGCTCGGGGACCTGCAGCC 1860
 R R G A V A R G L L E E G A G L G Q V D

1861 GCCACAGGTCTGTCCCACTGGGGCCGAGCTGCCGCGCGCCTACCACCGGCAGCGGGCCC 1920
 A T D L L T V G A D V A A R I T A T A R

1921 GCGCCAGGCCCCGAGGCATCTTCAGCCACCAGCCGTCCGTCCGGCTCGGGGACCCGTGACT 1980
 A R D P R G Y F D T T P L C G L G Q A S

1981 GGCCTTCCAGGGCGTCCCGCGCCTGGCCGCGCTTGGCGCCGCTGTGCCTTGGCC 2040
 V P L D R L A R V P P R P V A A S V S G

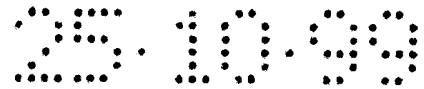
<orfup1

2041 CCGGGGACTCGGGCGGAGAGCGGGACATACGGAACCTCCACAGGGCGGAGCCGGGAACGGG 2100
 GGCCCCCTGAGCCCGCCTCTCGCCCTGTATGCCCTGGAGGTGTCCGCTCGGCCCTTGCCC
 A P S E P P S R S M

2101 ACGAGGGCGAGGACGGGACGGAACGAAGGAGAGGACGGGACGGACAGCACGGACGGGACG 2160
 TGCTCCCGCTCCTGCCCTGCCTTGCTTCCTTCCTGCCCCTGCCTGTCGTGCCTGCCCTGC

2161 GACGGAACGGAGTCCGGAAACCGGGGGGGTGACCGGAACCGGGCCGTCCCTGGCCCTCCC 2220
 CTGCCTTGCCCTCAGCCCTTGGCCCCCCCCCACTGGCCTTGGCCCCGGCAGGAACCGGGAGGG

2221 CCGTCCCTCCCGCCATCCGCGGTTCCTCCCGGTTCCTCTCCCGTCCCTCCAGCCAACACC 2280
 GGCAGGAGGGGCGGTAGGCGGCAAGAGGGGCAAGGGAGAGGGCAGGAGGTCCGTTGTGG



2381 GCCGCCCTTTCCAAGCGCTTGACACGGCACCGACAGCCGCCCGGGCGCCCGATGGGGA 2340
CGGCGGGAAAGGTTCCGCGAACTGTGCCGTGGCTGTCCGGCGGGCCCCGGGGCTACCCCT

2341 CCCGTGCCCGCCGGTGAGCGGGCGGTGAGCGCCGGTACGGGACCCACGCGCCCGCCCGG 2400
GGGCACGGGGCGGCCACTCGCCGCCACTCGCGGCCATGCCCTGGGGTGC GCGGGCGGGG

2401 GGCGCCCGCCAGGGCCCGCGGGCCACCCCGGCCCGCCCGGGCGGAGCGGCGATCCGGG 2460
CCGCGGGCGGTCCCCGGGCGCGCCGGTGGGGCCGGGCGGGGCCCTCGCCGCTAGGCC

2461 CCGCTCGCTGCAAGAGGAACATCCACAGCCGCACAAGGAGCGCTCCGCACAGTGGGCACC 2520
GGCGAGCGACGTTCTCCTTGTAGGTGTCCGGCTGTTCTCGCGAGGCGTGTACCCCGTGG

2521 ACGTCCGCCCCGTCCTCCCAACACCGTGGCCGGTCCCCACCGGACAGCACAGCACCGCACAG 2580
TGCAGGCGGGGCGAGGGGTGTGGCACCCGGCCAGGGGTGGCCTGTCTGTGTCGTGGCGTGT

2581 CACCACATCGCACGGCACAGCACAGCACCCACCGGCACGAGGAACCAAGGAAAGGAACCAC 2640
GTGGTGTAGCGTGCCGTGTCTGTCTGTGGTGGCCGTGCTCCTTGGTTCCTTTCCTTGGTG

cas1>

M T S V D C T A Y G P E L R A L A A

2641 ACCACCATGACCTCAGTGGACTGCACCCGCTACGGCCCCGAGCTGCGCGCGCTCGCCGCC 2700
TGGTGGTACTGGAGTCACCTGACGTGGCGCATGCCGGGGCTCGACGCGCGGAGCGGGCGG

2701 CGGCTGCCCGGACCCCCCGGGCCGACCTGTACGCCTTCTGGACGCCCGGCACACAGCC 2760
R L P R T P R A D L Y A F L D A A H T A

2761 GCCGCCTCGCTCCCCGGCGCCCTCGCCACCGCGCTGGACACCTTCAACGCCGAGGGCAGC 2820
A A S L P G A L A T A L D T F N A E G S

2821 GAGGACGGCCATCTGCTGCTGCGCGGCCTCCCGGTGGAGGCCGACCGGACCTCCCCACC 2880
E D G H L L L R G L P V E A D A D L P T

NcoI

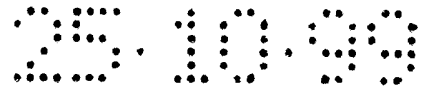
2881 ACCCCGAGCAGCACCCCGGGCGCCCGAGGACCGCTCCCTGCTGACCATGGAGGCCATGCTC 2940
T P S S T P A P E D R S L L T M E A M L

KpnI

2941 GGACTGGTGGGCGCCGGCTCGGTCTGCACACGGGGTACCGGGAGCTGCGCTCGGGCAGC 3000

25.10.99

G L V G R R L G L H T G Y R E L R S G T
 3001 GTCTACCACGACGTGTACCCCGTCGCCCGCGCCGACCCACCTGTCCTCGGAGACCTCCGAG 3060
 V Y H D V Y P S P G A H H L S S E T S E
 3061 ACGCTGCTGGAGTTCCACACGGAGATGGCCTACCACCGGCTCCAGCCGAACCTACGTCATG 3120
 T L L E F H T E M A Y H R L Q P N Y V M
 3121 CTGGCCTGCTCCCGGGCCGACCACGAGCGCACGGCGGCCACACTCGTCCGCTCGGTCCGC 3180
 L A C S R A D H E R T A A T L V A S V R
 3181 AAGGCGCTGCCCTGCTGGACGAGAGGACCCCGGGCCCGGCTCCTCGACCCGGAGGATGCCC 3240
 K A L P L L D E R T R A R L L D R R M P
 3241 TGCTGCGTGGATGTGGCCTTCCGCGGGGGGGTGGACGACCCGGGCGCCATCGCCCAGGTC 3300
 C C V D V A F R G G V D D P G A I A Q V
 3301 AAACCGCTCTACGGGGACCGGACGATCCCTTCCCTCGGGTACGACCCGGGAGCTGCTGGCG 3360
 K P L Y G D A D D P F L G Y D R E L L A
 3361 CCGGAGGACCCCGCGGACAAGGAGGCCGTCGCCCGCCCTGTCCAAGGCGCTCGACGAGGTC 3420
 P E D P A D K E A V A A L S K A L D E V
 3421 ACGGAGGCGGTGTATCTGGAGCCCGCGGATCTGCTGATCGTCGACAACCTCCCGCACCAG 3480
 T E A V Y L E P G D L L I V D N F R T T
 3481 CACCGCGGACCGCGTTCTCGCCCCGCTGGGACGGGAAGGACCGCTGGCTGCACCGCGTC 3540
 H A R T P F S P R W D G K D R W L H R V
 3541 TACATCCGCACCGACCGCAATGGACAGCTCTCCGGCGGGAGCGCGGGGCGACGTCGTC 3600
 Y I R T D R N G Q L S G G E R A G D V V
 A F T P R G * *SacI*
 3601 GCCTTACACCCGCGCGGCTGAGCTCCCGGGTCCGACACCGCGCGGCTGAACCCACGGTCC 3660
 CGGAAGTGTGGCGCGCCGACTCGAGGGCCCGAGGCTGTGGCGCGCCGACTTGGGTGCCAGG
 3661 GGGGCCCCACGGTCCGGCACCGCGCGGCTGAGCCCCCGGGTCCGGCAGCGGGCGGCTGAAC 3720
 CCCCCGGTCCAGGCCGTTGGCGCGCCGACTCGGGGGCCCGAGGCGGTCCGCCCGCCGACTTG



3721 CCCCCCCCCGGGCCACCGCCCGACCGCCCCCGCGCACCGGACGCGCCCGCCTGTACGGCG 3780
 GGGGCGGGGCCCCGFTGGCGGGCTGGCGGGGGCGCGTGGCCTGCGCGGGCGGACATGCCCGC

3781 GTCCCCGCCCGGGCCCCGTACACCTGAAGCGCCCGGGGACCGCCCGCCCCCGGGGGGACGG 3840
 CAGGGCGGGCCCCGGGCATGTGGACTTCGCGGGCCCGCCTGGCGGGCGGGGGCGGCCCCCTGCC

-----> <-----

3841 ACAGAGCCCGGTGCGGGAGGACGTCTCCCGCACCCGGCTCCACCGTTCCGCACCGACC 3900
 TGTCTCGGCCACGSCCTCCTGCAGGAGGGCGTGGGCCGAGGGTGGCAAGGCCTGGCTGG

3901 GCACCCGACCGTGC CGCAGGCGCCACCGGCACCGCACCGCCCCGCGCCGGCAGCCACCACA 3960
 CGTGGGCTGGCACGGCGTCCGCGGTGGCCGTGGCGGTGGCGGGCGCGGCCGTCGGTGGTGT

3961 GGCGCCACGCCGCCCGCACGGTGGCCGCGCTGCTCAGCCCCCGTCCACCGGGCTGTCCAG 4020
 CCGCGGTGCGGGCGGGCGTGGCACGGGCGCGACGAGTCGGGGGCGAGGTGGCCCCGACAGGTC

* G G D V P S D L

4021 GTCGGCGGGCTGCGCGGGGGGCTACTTGAGGGCCAGCCCGCGGCTGGGGGGCCTGGGGCG 4080
 L R R L A G G I F E R D A A S G G S G A

4081 CTCTACGGGGGTGTGAGGGCCCTAGTGGAGGTCGCTCCGTATGCCGTCTAGCCGGTG 4140
 L H G W V G P I V E L S A Y P L L D A V

4141 GGCGAAGAGCAGGAGCTGCCGCTTTGTGTGCAGGTCCCGCGGGCCGTCGTTGGTGCCGGGC 4200
 R K E D E V A F C V D L A G P L V V A R

4201 GCGGCACTGCCTCCGGTCCGCGGGGAGCTGCGAGGGGGGCGGGGGCCACAGCGGGGGTG 4260
 A T V S A L A A E V S G G A G P T A G V

NcoI

4261 TAGGCACAAGAGGGTCCACGCGTGGTACCACTCGTCTAGGCGCCGCGGCCCGGGCCTCTC 4320
 D T N E W T R V M T L L D A A G P G S L

4321 CTTCTGGACGAGGGTCTTCGGCCACTCCATGAGGAGCGCCACCGCTTTGGGTCGAGGGC 4380
 F V Q E W F G T L Y E E R T A F G L E R

4381 CACCCGTGCCGCCCGGGTCTTCCTTGCCTCCAGGGGGTGGGCGGCTTGTGGGCGGGGCG 4440
 H A R R A W F S R S T G W G A F V R G A

4441 GCGGAAGGCGGGGGCGAGGGGCGCAGCCGCGACTCGCGGCGCCGGTCTGGCCCTGTCGTC 4500
 A K R G R E G A D A S L A A A L G S L L

 4501 CTGGTCCGACACGCCCCGACGAGTGGCCGCGGGGCGTCTAGCCCCGCTAGGCCCGCTGGTA 4560
 V L S H P S S V P A G C I P A I R R V M

 4561 GGGGCCTACGCTGTGCCGGGTGACCATCCGCACCCGCGCGGGTAGCTGGTCCGGGCACTG 4620
 G P H S V A W Q Y A H A A G M S W G T V

 4621 GTCCCGGTCAAGGGCATGGGGGTGAGGAGCCACTCGTCCGCCACGACCGGGCGCTGTAA 4680
 L A L E R V G L E E T L L R H Q A A V N

 4681 CAGGACGCCTCACTAGTCGCCTTTCCGCCCTGGGGCTGCCACCAACGGCCCCGCTCGACCT 4740
 D Q P T I L P F R S G S P H N G P S S S

 4741 CTGGGGCAACGGCTTCTCAGGCCGCCACTGCTGCGTCAAGGGGCCCCACAGGTCCGCCGTC 4800
 V G N G F L G A T V V C Y R R T D L P L

 4801 GGGGCGTGGCTAGTCGGTCAGCATGGGCCACACCAGGGCCGGCTTCTTGCTGCCTGTCTC 4860
 G A G I L W D Y G T H D R G F F S P C L

 4861 GTGGTGCAAGCAGGGCAGCCGCAAGCCGACGGCATGTACCGCATTGGCTAGGCCCGCAG 4920
 V V N T G D A N P T G Y M A Y G I R A D

 <orfdwn1
 4921 GCGGTCCTGGAGGGGCGAGTGGTGGCCGTCAGCAGCTAGAGCTTATACGCCGTAAGGTG 4980
 R L V E G D L L P L E D I E F I R C E M

 4981 GCGACTGGAGGAACAAGCTAGGGGGCCTGTTGTCCAGCCAGCACCGGCCTCTGAGTCTC 5040
 * L

 5041 GGTCACCCCCGCTAGAGCCACCGGGTGTGAGGTCCGACCGTCCGACCTGTAGCACGCC 5100
 W N P A I E T A W L E L S R L Q V D H P

 5101 CTAGTCCGGCCCTCATGACCGTGACCTCGTCTATGAGGCCCTAGCACGGCCGAGGTGGTCCGAA 5160
 I L G S Y Q C Q L L Y E P D H R E V L K

 5161 GAGCTAGTACGCCAACTACAGCAGGCCCCACGGCTGGGTGAGGTCCGGGGCCAGCTGGTC 5220
 E I M R N I D D P T G V W E L G R D V L

25 10 99

5221 CCAGAACATCAGGCTCGGCTAGCCTGGGCAGAGCGGCCAGCGCGCTCGCGGAGCCACTT 5280
 T K Y D S G I P G T E G T A R L A E T F
 NcoI
 5281 CCGGTACCCCGGCTTGGTCAAGAGCTTCTACTTCGGCGGGCGGGCCCTGCGGGTCACCAC 5340
 G M P G F W N E F I F G G G R S A W H H
 5341 CCGGAGCGGCCTCAGGGCCCTCTGGTCTGCAGGAAGTAGTGGGGCTGGGCGAGCGGGGC 5400
 A E G S D R S V L V D K M V G V R E G R
 5401 GGCGTCCCACGGCACCCGGGCGGGAGCCGGAGGAGGGCCATCTACAGGTAGTGGCCCCG 5460
 R L T G H G A A E A E E R Y I D M L R A
 5461 CTGCTAGACCAGCAGCCACAAGTAGTCTAGCCGTGGTGGGGAGGGCCCGTGTCTTGGC 5520
 V I Q D D T N M L I P V V G E R A C F R
 5521 CTTGCACAGGAGTGACTTCGACTTGGCGACCTTCTGCCCCCCACCCCGGACCATCCC 5580
 F T D E S F S F P Q F V P P H P R Q Y P
 5581 GAACCCGCGCTACGGGTGGAGCGCCTACTGCGGCAAGAGCAGCTCCGGGGCCGGCATCGC 5640
 K P A I G V E R I V G N E D L G R G Y R
 5641 CGCGTGGCGGAGCATCCCCCTTGAGGTCCAGGCCGTGGCCCTAGCAGGTGACGAGGGGCCCT 5700
 R V A E Y P F E L D P V P I T W Q E G S
 5701 CACCCACTTGCAGAGCCAGCAGGTGCCGAAGAATACTACTAGAGGGTCACGAGGAGCTTCTC 5760
 H T F T E T T W A K K I I E W H E E F L
 5761 CCGTGCTAACCGGCCAGGGCGAGGGGCCGAGCCTGTCCCACGGCGGGCTGGGGCATGTG 5820
 A R N R R D R E G A D S L T G G V G Y V
 5821 GACGGGGTACTACAGCCGGGTCCGAAGACCTTGGGCGCGCGCTAGGGCTGCTTCCGCGC 5880
 Q G M I D A W R K Q F G R A I G V F A R
 5881 CGGGGCCCAGTACACCAGCTCGTAGCGGTCTAGGAGCCGGTCCGGCGTCCGCTAACACGTC 5940
 G R T M H D L M A L D E A L R L P N H L
 5941 GCCGTCTGCAACCGGTAGACCGGCTGGGCCTACACGGCCCCAGACGTACGGCTCCATCTC 6000

P L V N A M Q G V R I H R T Q M G L Y L

6001 GGGGTCGTACTAGCCCAACAACCTCTGGAGCTTTGGGAGCCACACCTTCACCACGAGCCA 6060
G L M I P N N S V E F G E T H F H E E T

6061 CTTCCCTGTCAGGGGTCATCGGCTCAAGCAGCCGGCGGACGGCGGACGGCCCCACTCGACGGC 6120
F S L G W Y G L E D A A Q A Q R T L Q R

6121 CTCGTACAAGACCATCAAGACGCCTAACTGGGGGCGGTATGGGGCGACCTGGACGCCTAC 6180
L M N Q Y N Q P N V G A M G R Q V Q A H

<orfdown2

6181 ACTGCCGACCGTTGGCAGATAGAAGAGAATGGACTTCACCCCTGGCTCCTCCGGTTCCGGG 6240
TGACGGCTGGCAACCGTCTATCTTCTTACCTGAAGTGGGACCGAGGAGGCCAAGCGCC
S G V T P L Y F L I S K M

6241 CGCCCTCCATTGACGTGCGCCGAAAGCGGCTCGACCGTCCCCTCCGCCCTTGAGTTCCG 6300
GCGGGAGGTAAGTGCACGCGGCTTTCGCCGAGCTGGCAGGGTGAGGCGGGAAGTCAAGGC

6301 TCTGACGCCGCGCCAGTCCGGCGGGCCGTCCGCCGGGGTGCCCGCGGGGTCCGCACCCGC 6360
AGACTGCGGCGCGGTGAGCCGCCCGGCGAGGCGGCCCCACGGGCGGCCCCAGGCGTGGGCG

6361 CGGACGGCACGGGCGCGCACCGCGCGCGGGCGCTTCGGGGCACCGGGCTCGACGGGGTGC 6420
GCCTGCCGTGCCGCGGTGGCGCGCGCGCGGGAAGCCCCGTGGCCCGAGCTGCCCCACG

6421 TCAGCGGGACGTCCAACGGAAGGCAAGCCCCCGTACCCAGCCTGGTCAAGGCGCTCATCG 6480
AGTCGCCCTGCAGGTTGCCTTCCGTTCGGGGGCATGGGTCCGACCAAGTTCCGCGAGTAGC

orfdown3>

M P G

6481 CCATTCCCTGAGGAGGTCCCGCCTTGACCACAGCAATCTCCGCGCTCCCGACCGTGCCCG 6540
GGTAAGGGACTCCTCCAGGGCGGAAGTGGTGTCTGTTAGAGGCGGAGGGCTGGCACGGGC

6541 GCTCCGGACTCGAAGCACTGGACCGTGCCACCCTCATCCACCCACCCCTCTCCGGAACA 6600
S G L E A L D R A T L I H P T L S G N T

6601 CCGCGGAACGGATCGTGCTGACCTCGGGGTCCGGCAGCCGGGTCCGCGACACCGACGGCC 6660
A E R I V L T S G S G S R V R D T D G R

6661 GGGAGTACCTGGACGCGAGCGCCGTCCTCGGGGTGACCCAGGTGGGCCACGGCCGGGCCG 6720
 E Y L D A S A V L G V T Q V G H G R A E

6721 AGCTGGCCCCGGGTGCGGGCCGAGCAGATGGCCCCGCTGGAGTACTTCCACACCTGGGGGA 6780
 L A R V A A E Q M A R L E Y F H T W G T

6781 CGATCAGCAACGACCGGGCGGTGGAGCTGGCGGCACGGCTGGTGGGGCTGAGCCCCGAGC 6840
 I S N D R A V E L A A R L V G L S P E P

6841 CGCTGACCCGCGTCTACTTCACCAGCGGGCGGGCCGAGGGCAACGAGATCGCCCTGCGGA 6900
 L T R V Y F T S G G A E G N E I A L R M

6901 TGGCCCCGCTTACCACCACCGGCGCGGGGAGTCCGCCCGTACCTGGATACTCTCCCGCC 6960
 A R L Y H H R R G E S A R T W I L S R R

6961 GGTCCGCCTACCACGGCGTCGGATACGGCAGCGGGCGGTCACCGGCTTCCCCGCCTACC 7020
 S A Y H G V G Y G S G G V T G F P A Y H

7021 ACCAGGGCTTCGGCCCCCTCCCTCCCGGACGTCGACTTCCTGACCCCGCCGAGCCCTACC 7080
 Q G F G P S L P D V D F L T P P Q P Y R

7081 GCCGGGAGCTGTTCCGGGTTCCGACGTCACCGACTTCTGCCTCGCCGAACTGCGCGAGA 7140
 R E L F A G S D V T D F C L A E L R E T

Sau

7141 CCATCGACCGGATCGGGCCGGAGCGGATCGCGGCGATGATCGGCGAGCCGATC
 I D R I G P E R I A A M I G E P I

Patentové nároky

1. DNA obsahující jeden nebo více genů specifických pro biosyntézu 5S klavamu v *S. clavuligerus*, které nejsou zásadní pro biosyntézu 5R klavamu.
2. DNA zvolená ze souboru sestávajícího z
 - a) DNA podle nároku 1, jak je uvedena na obr. 1 (SEQ ID No: 1),
 - b) DNA podle nároku 1, která má sekvenci stejnou nebo v podstatě stejnou jako je sekvence uvedena na obr. 1 a označená jako orfup3, orfup2, orfup1, orfdwn1, orfdwn2 nebo orfdwn3 (SEQ ID No: 2-7),
 - c) DNA podle nároku 1, která má sekvenci stejnou nebo v podstatě stejnou jako je sekvence uvedena na obr. 1 označená jako orfup1 (SEQ ID No: 4) a
 - d) DNA, která hybridizuje za podmínek vysoké přísnosti s DNA podle a) až c) výše nebo s DNA podle nároku 1.
3. Vektor zvolený ze souboru sestávajícího z
 - a) vektoru obsahujícího DNA podle nároku 1 nebo 2,
 - b) vektoru obsahujícího DNA podle nároku 1 nebo 2, ve kterém byl jeden nebo více genů specifických pro biosyntézu 5S klavamu narušen nebo jinak vyřazen z činnosti a
 - c) vektoru pCEC060, pCEC061, pCEC056, pCEC057 nebo pDES3.
4. Hostitel zvolený ze souboru sestávajícího z

(náhradní strana)

- a) hostitele obsahujícího vektor podle nároku 3,
 - b) hostitele obsahujícího vektor podle nároku 3, který je schopen produkce zvýšeného množství kyseliny klavulanové,
 - c) hostitele obsahujícího vektor podle nároku 3, který je schopen produkce sníženého nebo žádného množství 5S klavamu a
 - d) hostitele obsahujícího vektor podle nároku 3, kterým je *S. clavuligerus*.
5. *S. clavuligerus* obsahující DNA odpovídající otevřenému čtecímu rámci obklopujícímu *cas1*, kde uvedená DNA byla narušena nebo jinak vyřazena z činnosti.
6. *S. clavuligerus* podle nároku 5, kde otevřeným čtecím rámcem je *orfup3*, *orfup2*, *orfup1*, *orfdwn1*, *orfdwn2* nebo *orfdwn3*.
7. Způsob pro zlepšení produkce 5R klavamu ve vhodném mikroorganismu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje použití DNA podle nároku 1 nebo 2 a její vložení do uvedeného mikroorganismu.
8. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedeným vhodným mikroorganismem je *S. clavuligerus*.
9. Způsob pro zlepšení produkce 5R klavamu ve *S. clavuligerus*, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje narušení nebo jiné vyřazení DNA regionů sousedících s *cas1*.
10. Způsob podle některého z nároků 7 až 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená DNA odpovídá otevřeným čtecím rámcům *orfup3*, *orfup2*, *orfup1*, *orfdwn1*, *orfdwn2* nebo *orfdwn3*.

11. Způsob podle některého z nároků 7 až 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedeným 5R klavamem je kyselina klavulanová.
12. Způsob pro identifikaci mikroorganismu vhodného pro produkci 5R klavamu ve vysokém množství, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje předběžné vyhledávání mikroorganismů s nízkou nebo žádnou produkcí 5S klavamu.
13. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že mikroorganismem je *S. clavuligerus*.
14. Způsob podle nároku 12 nebo 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že 5R klavamem je kyselina klavulanová.
15. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 12 až 14, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jeden nebo více genů specifických pro produkci 5S klavamů je defektní.
16. Mikroorganismus, který je vybrán ze souboru sestávajícího z
- a) mikroorganismu, který je schopen produkce 5R klavamu a nízké nebo žádné produkce 5S klavamu, který je možno získat způsobem podle jakéhokoliv z nároků 7 až 15,
 - b) mikroorganismu, který je schopen produkce 5R klavamu a nízké nebo žádné produkce 5S klavamu, který je možno získat způsobem podle nároku 12, který je schopen produkce kyseliny klavulanové, ale neprodukuje klavam-2-karboxylat a/nebo 2-hydroxymethylklavam,
 - c) mikroorganismu, který je možno získat způsobem podle nároku 12, kterým je kmen 56-1A, 56-3A, 57-2B, 57-1C, 60-1A, 60-2A,

(náhradní strana)

60-3A, 61-1A, 61-2A, 61-3A nebo 61-4A.

17. Kyselina klavulanová, kterou je možno získat fermentací mikroorganismu podle nároku 16.

18. Kyselina klavulanová podle nároku 17, která neobsahuje nebo má významně snížený obsah klavam-2-karboxylatu.

19. Kyselina klavulanová podle nároku 18, která je ve formě draselné soli.

20. Kyselina klavulanová, která neobsahuje nebo má významně snížený obsah 5S klavamu.

21. Kyselina klavulanová, která neobsahuje nebo má významně snížený obsah klavam-2-karboxylatu.

22. Prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje klavulanat draselný podle nároku 19 v kombinaci s beta-laktamovým antibiotikem.

23. Prostředek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že beta-laktamovým antibiotikem je amoxicillin.

24. Způsob přípravy prostředku obsahujícího klavulanat draselný a amoxicillin, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje produkci kyseliny klavulanové mikroorganismem podle nároku 12 a potom přeměnu na formu draselné soli a kombinování s draselnou solí amoxicillinu.

(náhradní strana)